

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659054

研究課題名（和文） 薬剤併用作用のプロモーター解析基盤の開拓

研究課題名（英文） Development of promoterome analysis platform for combinatorial drug effects

研究代表者

鈴木 治和 (SUZUKI HARUKAZU)

独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発グループ・プロジェクトディレクター

研究者番号：80333293

研究成果の概要（和文）：

薬剤効果をプロモーターレベルのトランスクリプトームでとらえ、単剤の効果や併用をプロモーター活性プロファイルの相加、相乗、拮抗で説明できるかを検証した。MCF7 細胞を用い Gefitinib の EGFR 阻害効果プロファイルを、影響する下流のシグナル伝達系阻害剤である U0126、ワルトマニンのプロファイルで記述することに成功した。一方、単剤プロファイルから併用効果を予測することは現状では困難であることが分かった。本研究結果から、薬剤効果をプロモーターレベルで解析する基盤を、ほぼ確立した。

研究成果の概要（英文）：

We tried to evaluate whether drug effects and/or combinatorial drug effects can be represented by promoter activity profiles. We found that effect (promoter profile) of Gefitinib, an inhibitor of mutated-EGFR in MCF7 cells, can be represented by those of U0126 and Wortmannin, the potent inhibitors of the downstream signal transductions. However, it was hard to precisely predict combinatorial drug effects (profiles) by using the single drug profiles. We concluded that we have established the promoter-based platform to analyze drug effects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	180,000	2,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：プロモーター、CAGE、薬剤作用、トランスクリプトーム、合剤、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

2つ以上の薬剤を組み合わせた多剤併用は、疾患治療で非常に有用である。しかしな

がら、用いられている併用薬物のほとんどは、作用点は異なるが同じ薬効をもつ複数の薬

物、あるいは論理的に薬物効果が高まることが期待できる薬物の組み合わせにすぎない。一方で、薬剤併用は、各薬剤の治療効果を減弱させる場合、あるいは副作用をもたらす場合も多々知られている。これらの多くは臨床の場で、予期しない作用として発見されたものである。よって、薬剤併用において、主作用に対する影響や副作用発現の有無についての予測は非常に重要である。薬剤作用は必ず多くの遺伝子発現（トランスクリプトーム）に影響を与える。このことから、マイクロアレイを用いて薬剤効果を遺伝子レベルで系統的に調べる試みが盛んに行なわれている。

研究代表者の所属する理研オミックス基盤領域は、世界のトランスクリプトーム研究を常にリードしてきた。この原動力の一つには、ゲノムワイドにプロモーター活性を検出できる唯一の技術である、我々が独自に開発したCAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 法がある。CAGE 法は、キャップ構造を持つ転写物 (RNA) の 5' 末端 20-27 塩基を用いてライブラリーを作成し、大規模にシーケンス解析する手法である。CAGE 配列 (タグ) のゲノム上へのマップにより、1 ベースの精度でゲノム上の転写開始点を網羅的に同定できる。さらに、マップされたタグの頻度はその位置からスタートする転写物の発現量を表しており、転写物を制御する近位プロモーターの活性も表している。

これまで我々は CAGE 法を用いてヒトやマウスの正常組織、培養細胞のプロモーター解析を行ってきたが、薬剤作用に関する詳細なプロモーター解析は未着手であった。その理由は、哺乳動物のプロモーター情報を、より多く収集し、その全体像を理解することが最重要であったからではなく、技術面での制約から研究への着手を待つ必要があった。す

なわち、1) 最低百万単位の CAGE タグを集めなければ、特定細胞におけるプロモーター活性を詳細記述するのに十分でないこと、2) CAGE ライブラリーの調製過程において、PCR を用いたタグの増幅ステップでバイアスが生じる問題があり、わずかなプロモーター活性の変化をも厳密に捉えることが困難であったことによる。しかしながら、1) については上述した deepCAGE 法によって数百万の CAGE タグを短時間かつリーズナブルなコストで得られるようになった。また、2) についても PCR を用いない Non-amplified CAGE ライブラリー調製法の開発に成功し、低レベルの発現から 5 桁以上の直線性を持つ、定量性が極めて高いデータが得られるようになったため、上記の制約はなくなった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬物併用効果をプロモーター活性の解析基盤で捕らえることの可否を見極めることにある。すなわち、薬剤併用による効果亢進をモデルとして、CAGE 法を用いて薬剤効果をプロモーターレベルで捉える。効果亢進がプロモーター活性の相加、相乗、拮抗にどのように現れるのか、また、各薬剤のプロモータープロファイルから併用効果を予測できるのかを調べ、我々のアプローチ法が薬剤併用効果に対して指標を付与することができるかどうかを検討する。

本研究の学術的な特色は、ゲノム科学で世界トップレベルの革新的トランスクリプトーム解析技術を、医療・薬理学分野へ応用を図ることにある。薬剤効果を正確にとらえるためには、遺伝子レベルでは無く、プロモーターレベルの解析が必須である。その理由は 2 点に集約される。

1) 我々が行なった大規模プロモーター解析から、発現遺伝子の 60%は複数のプロモーター (Alternative promoters) を有することが

わかった。さらに、転写因子ノックダウン実験により、Alternative promoters では、各プロモーターが異なる制御を受けており、その総和が遺伝子発現として観察されることがわかった。よって、薬物作用を詳細解析するためには、個々のプロモーターレベルでの解析が必須である。

2) ゲノムから発現する転写物の半分以上は、蛋白質をコードしない Non-coding RNA であり、転写制御に重要な役割を果たしている知見が蓄積されている。マイクロアレイでは Non-coding RNA の発現解析が不可能であり、ゲノムワイドな解析が可能な CAGE 法が必須となる。

本研究が成功した場合、薬剤併用研究に対して明確な指標を付与する革新的な手法が提供でき、当研究分野の飛躍的な発展に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

抗がん剤の薬剤併用による効果亢進をモデルとして解析する。標的分子は異なるが、異なったシグナル伝達経路あるいは同一のシグナル伝達経路に作用して相乗効果を表す薬剤併用について、プロモータープロファイルを取得する。得られたプロファイルを単剤でのプロファイルと比較解析することにより、薬物併用効果をプロモーター活性の相加、相乗、拮抗で説明することが可能かどうかを評価する。

ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞をモデルとして用い、変異 EGFR に結合して MEK-ERK 情報伝達系を阻害する抗がん剤ゲフィチニブ(商品名「イレッサ」)、MEK 阻害剤である U0126、PI3K 阻害剤として PI3K-AKT 情報伝達系を阻害するワルトマニンを用いる。薬剤濃度は文献情報を参考とするが、その前後で濃度をふって、効果が再現良く得られる IC50 前後の

濃度を選択する。これら薬剤は最終的には MCF7 細胞にアポトーシスを起こすため、それに先立つ時間で細胞を回収し、トータル RNA を調製する。同じ実験を繰り返して、各 3 サンプル作成する。

トータル RNA から deepCAGE ライブラリーを作成し、CAGE タグを大規模シーケンス解析する。正確な定量データを得るために、ライブラリー調製においてはバイアスがかからない Non-amplified deepCAGE 法を用い、次世代シーケンサーによりシーケンスする。各ライブラリーについて最低数百万の CAGE タグを得る。

コンピュータを用いて CAGE タグをゲノム上にマップ/クラスタリングし、ゲノムワイドな転写開始点情報とその頻度情報を得る。このデータについて、バイオインフォマティクスを用いて、単剤および薬剤併用におけるプロファイルと比較解析する。

4. 研究成果

各薬剤について中程度の作用を示す薬剤濃度を実験で決定し、各薬剤および薬剤併用した細胞から調製した RNA を用いて、解析バイアスのない Non-amplified CAGE 法により大規模プロモーターデータを取得した。得られた CAGE タグをゲノム DNA 上にマップしたのち、近傍のタグをクラスタリングして更なる解析に供した結果、以下の知見を得ることができた。

・MCF7 モデル系では計 11,403 の有意に発現しているプロモータークラスターが同定され、そのうち 9,185 クラスターが特定の遺伝子とリンクしていた。クラスターレベルでの発現頻度比較によって、3回の繰り返し実験 (replicates) 間で極めて高い相関 (>0.99) が観察され、高品質のデータが取れたことが証明された。

・各単剤でのプロモーター発現プロファイルと薬剤併用したプロファイルとを比較検討した。薬剤無処置プロファイルとの発現変動差を用いて関係を調べたところ、薬物併用の効果が相加的に表れることを発見した。薬剤無処置プロファイルとの発現変動比を用いた場合、薬剤併用効果を単剤の相加・相乗で表すことはできなかった。

・ゲフィチニブは主作用である MEK-ERK 情報伝達系の阻害のほかに、PI3K-AKT 情報伝達系に対する弱い阻害作用を持つことが知られている。このゲフィチニブのプロモータープロファイルを、パラメーターを用いて U0126 とワルトマニンのプロファイルで表すことができた。また、ゲフィチニブ+U0126、ゲフィチニブ+ワルトマニンの合剤（これらはゲフィチニブと比べて MEK-ERK 情報伝達系と PI3K-AKT 情報伝達系の阻害がそれぞれ亢進したバーチャル薬と見立てることができる）についても U0126 とワルトマニンのプロファイルで表現することができた。

・CAGE 解析を行った同じサンプルを用いて、マイクロアレイのデータも取得し、薬剤併用効果が遺伝子レベルで説明できるかを調べたが、相加性が十分に取れないことが分かった。ハイブリダイゼーションを基盤とするアレイ解析では、発現の低い遺伝子ではプローブに非特異的に結合するノイズのマイナス効果、発現の高い遺伝子では飽和効果、さらに遺伝子レベルでの集約したデータによるマイナス効果から、併用効果が定量的に説明できないものと考えられた。

・単剤効果のプロファイルから、合剤の効果の予測を試みた。合剤のプロファイルは上記にも記載したように、単剤のプロファイルにパラメーターを用いることにより記述できる。しかしながら、パラメーター値の事前予測は現時点でできておらず、このことから合

剤効果の予測は現時点では難しいと結論した。ただし、パラメーターの範囲は予測できるので、範囲を持った形での合剤効果の予測は可能と思われる。

ゲフィチニブの効果が U0126 とワルトマニンのプロファイルによって定量的に表せることは、複雑な薬剤効果を分解して表すことが可能であることを示しており、薬剤作用の定義を試みるうえで重要な知見である。我々は本研究結果から、プロモーターレベルの解析により薬剤効果を測定し、その効果をプロファイルする解析基盤が、ほぼ確立できたと判断した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)
論文発表準備中

[学会発表] (計 4 件)

1. Kazuhiro Kajiyama et al. Quantitative analysis of promoter activity to evaluate a combinatorial effect of kinase inhibitors targeting the EGFR pathway. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜・パシフィコ横浜
2. 鈴木 治和、次世代シーケンサーを用いた神経疾患のオミックス解析、第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会（招待講演）、2011 年 6 月 4 日、京都・京都テルサ
3. 鈴木 治和、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析の新展開、千里ライフサイエンスセミナー、2010 年 10 月 22 日、大阪・千里ライフサイエンスセンター
4. 鈴木 治和、オミックスサイエンスから創薬へ、バイオジャパンアカデミックシーズ発表会、2010 年 10 月 1 日、横浜・パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 治和 (SUZUKI HARUKAZU)
独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開
発グループ・プロジェクトディレクター
研究者番号：80333293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし